

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 17 March 2000 (17.03.00)	
International application No. PCT/EP99/05145	Applicant's or agent's file reference 18061P WO
International filing date (day/month/year) 20 July 1999 (20.07.99)	Priority date (day/month/year) 20 July 1998 (20.07.98)
Applicant WILHELM, Olaf et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

04 February 2000 (04.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Claudio Borton Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWES

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Weickmann Weickmann Prechtel Weiss  
Tiesmeyer Herzog Böhm Liska & Huber  
Kopernikusstrasse 9  
81679 München  
ALLEMAGNE

PCT

31. OKT. 2000

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

30. 10. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
18061P WO

## WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP99/05145

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
20/07/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
20/07/1998

Anmelder

WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et.al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

THORNTON, J

Tel. +49 89 2399-8072



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

31. OKT. 2000  
Fertig  
Patentamt



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>18061P WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP99/05145</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>20/07/1999</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>20/07/1998</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>A61K31/495</b>		
Anmelder <b>WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et.al.</b>		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  <b>04/02/2000</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  <b>30.10.00</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Herrera, S</b>  Tel. Nr. +49 89 2399 8464  

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05145

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-28                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-18                      ursprüngliche Fassung

### Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,              Seiten:
- ☐ Ansprüche,                  Nr.:
- ☐ Zeichnungen,              Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 16.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 16 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

**siehe Beiblatt**

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

#### **IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.  
☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.  
☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
☒ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist  
☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☐ alle Teile.  
☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 1-9, 14-16, 18 beziehen.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9,14-16,18
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-9,14-16,18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	18
	Nein: Ansprüche	1-9,14-16

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt III**

Der Anspruch 16 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieses Anspruchs kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

**Zu Punkt IV**

Die vorliegende internationale Anmeldung enthält mehrere (Gruppen von) Erfindungen:

1. Ansprüche: 1-9, 14-16, 18

Verwendung von Verbindungen der Formel I zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokinaserezeptor-assoziierten Krankheiten

2. Ansprüche: 10-13, 18

Verwendung von Verbindungen der Formel II zur Herstellung eines Mittels für das Targeting von Lymphzellen.

A) Formel II ist viel breiter als Formel I und eigentlich nur als Phenylrest definiert.

Die Verbindungen der Formel II weisen die wesentlichen strukturellen Merkmale der Formel I nicht auf.

B) Außerdem sind die beanspruchten Verwendungen nicht durch ein gemeinsames Konzept verbunden (Targeting von Lymphzellen hat nichts mit Urokinase-assoziierten Krankheiten zu tun).

Beide oben genannten Gründe sind auch jeweils für sich genommen genügend, um die Einheitlichkeit zu verneinen (Regel 13(1) PCT).

**Zu Punkt V**

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1 WO 96 05189 A

D2 WO 92 08709 A

D3 WO 94 18185 A

D4 EP 0 183 271 A

D5 DE 30 35 086 A

D6 WO 95 17885 A

2. Die Verbindungen die in der vorliegende Anmeldung verwendet werden sind aus D1 bis D3 als Thrombin und/oder Trypsin Inhibitoren bekannt.

Aus D4 und D5 geht hervor, daß Inhibitoren von Thrombin und/oder Trypsin sehr oft auch Urikinasinhhibitoren sind.

Es muss also als naheliegend betrachtet werden, daß die in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Verbindungen auch Urokinase inhibieren.

Aus D6 ist bekannt daß Tumoren und vor allen die Bildung von Metastasen mit Hilfe von Urokinasinhhibitoren verhindert werden können.

Der Gegenstand der vorliegende Anmeldung fehlt daher die notwendige erfinderische Tätigkeit (Art 33 (3) PCT).

3. Die beanspruchte Verbindung (Anspruch 18) ist im Vergleich mit dem Stand der Technik neu. Sehr ähnliche Verbindungen sind aber aus D1 bekannt, mit dem gleichen Aktivität. Die Verbindung kann daher nicht als erfinderisch angesehen werden (Art 33 (3) PCT).

4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden



Ansprüche 1-9 und 14-16 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A61R 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61R 47/48</b>		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/04954</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 3. Februar 2000 (03.02.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/05145		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 20. Juli 1999 (20.07.99)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 98113519.7                      20. Juli 1998 (20.07.98)                      EP			
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D-81675 München (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b>		<b>Veröffentlicht</b>	
<b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WILHELM, Olaf [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D-81545 München (DE). MAGDOLEN, Viktor [US/DE]; Moosacherweg 3, D-85551 Kirchheim (DE). STÜRZEBECHER, Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, D-99094 Erfurt (DE). FOEKENS, John [NL/NL]; Filosofentuin 35, NL-2908 XA Capelle a/d IJssel (NL). LUTZ, Verena [DE/DE]; Sankt-Wolfgangs-Platz 9F, D-81669 München (DE).		<i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			
<b>(54) Title:</b> NOVEL UROKINASE INHIBITORS			
<b>(54) Bezeichnung:</b> NEUE UROKINASE-INHIBITOREN			
<b>(57) Abstract</b>  The invention relates to the use of derivatives of 3-amidino-phenyl-alanine as urokinase inhibitors for treating malignant tumors and the formation of metastases thereof.			
<b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.			

## Neue Urokinase-Inhibitoren

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidinophenylalanins als Urokinase-Inhibitoren insbesondere zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung bzw. als Mittel zum Targeting von Lymphzellen und zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, insbesondere von Lymphomen.

10

Die Fähigkeit solider Tumoren zur Ausbreitung und Metastasierung in umgebendes Gewebe korreliert mit dem Abbau bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (Tumorstroma) in der Umgebung der Tumorzelle, bzw. mit deren Fähigkeit zur Durchdringung der Basalmembran. Obwohl die (patho)biochemischen Zusammenhänge noch nicht endgültig aufgeklärt sind, kommen dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) und dem Urokinaserezeptor (uPAR) eine zentrale Bedeutung zu. uPA vermittelt die proteolytische Spaltung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin wiederum ist eine Protease mit breitem Wirkspektrum, die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und das Proteingerüst der Proteoglykane direkt abzubauen vermag. Außerdem kann Plasmin "latente" Metalloproteasen und das inaktive Proenzym von uPA, pro-uPA, aktivieren.

15

20

25

30

Tumorzellen und nichtmaligne Zellen des Tumorstromas synthetisieren und sezernieren das enzymatisch inaktive Proenzym pro-uPA. Proteasen wie z.B. Plasmin oder die Kathepsine B und L spalten pro-uPA durch limitierte Proteolyse zur aktiven Serinprotease HMW-uPA (HMW = high molecular weight). pro-uPA und die aktive Protease HMW-uPA binden an den Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87). Plasmin(ogen) bindet ebenfalls an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Tumorzelle, wodurch eine Fokussierung und Amplifikation der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der

- 2 -

Tumorzelle erreicht wird. Invasiven Zellen ist somit die Möglichkeit gegeben, die extrazelluläre Matrix abzubauen, ohne sich der für eine gerichtete Bewegung notwendigen Unterlagen durch Proteolyse zu entziehen.

5 In verschiedenen zellbiologischen Studien konnte gezeigt werden, daß dem zellassozierten Plasminogenaktivator-System innerhalb der kaskadenartigen Reaktionswege tumorassoziierter Proteolysesysteme ein besonderer Stellenwert zukommt (Wilhelm et al. (1994) The Urokinase/Urokinase receptor system: A new target for cancer therapy? In: Schmitt M., Graeff H.,  
10 Kindermann G. (Hrsg): Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer. International Congress Series, Excerpta Medica 1050, Amsterdam, Elsevier 1994, pp145-156). An Kulturen humaner Kolonkarzinomzellen wurde beobachtet, daß deren Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix zu durchwandern, vom Sättigungsgrad der uPA-Rezeptoren mit aktivem uPA  
15 abhängig ist (Hollas et al., Cancer Res. 51 (1991), 3690-3695). Ebenfalls im Zellkulturmodell wurde eine Reduktion des invasiven Potentials von Zellen beobachtet, wenn die proteolytische Aktivität von uPA durch PAI-1 (Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 6939-6943) oder PAI-2 (Baker et al., Cancer Res. 50 (1990), 4676-4684) gehemmt wurde. Ein  
20 vergleichbarer Effekt wurde bei Hemmung der Bindung von uPA an die Zelloberfläche durch Blockierung des Rezeptors mittels proteolytisch inaktiver uPA-Varianten erzielt (Cohen et al., Blood 78 (1991), 479-487; Kobayashi et al., Br. J. Cancer 67 (1993), 537-544). Auch die Transfektion epidermoider Karzinomzellen mit einem Plasmid, das ein Antisense-  
25 Transkript gegen einen Teil von uPAR exprimiert, führte durch Unterdrückung der uPAR-Synthese zur Verringerung der Invasivität dieser Zellen (Kook, EMBO J. 13 (1994), 3983-3991). Gegen uPA und PAI-1 gerichtete Antikörper reduzierten das invasive Potential von Lungenkrebszellen in vitro (Liu et al., Int. J. Cancer 60 (1995), 501-506).

30

Der Einfluß des Plasminogenaktivator-Systems auf den Metastasierungsprozeß konnte auch in Tumor-Tiermodellen belegt werden. So wurden die

- 3 -

durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen in Hühnerembryos durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA fast vollständig verhindert (Ossowski und Reich, Cell 35 (1983), 611-619). Metastasierende menschliche Karzinomzellen wurden mit einem Ex-  
5 pressionsplasmid transfiziert, das für eine proteolytisch inaktive, aber uPAR-bindende uPA-Mutante kodierte. Im Mausmodell zeigte sich, daß die Karzinomzellen, die inaktives uPA synthetisierten, nach Injektion im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Metastasen bildeten (Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 5021-  
10 5025). Nach Verabreichung von uPA-Antisense Oligonukleotiden wurde darüber hinaus eine Inhibierung der intraperitonealen Ausbreitung von humanen Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen beobachtet (Wilhelm et al., Clin. Exp. Metast. 13 (1995), 296-302).

15 In den letzten Jahren wurde die klinische Relevanz von Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht. Dabei erwies sich der uPA-Antigengehalt bei verschiedenen Tumoren (z.B. Brust, Eierstock, Magen, Lunge, Niere etc.) sowohl für das rezidivfreie Überleben  
20 als auch für das Versterben als ein starker Prognosefaktor (siehe beispielsweise Schmitt et al., J. Obstet. Gynaecol. 21 (1995), 151-165; Jaenicke et al., Breast Cancer Res. Treat. 24 (1993), 195-208; Kuhn et al., Gynecol. Oncol. 55 (1994), 401-409; Nekarda et al., Lancet 343 (1994), 117; Pedersen et al., Cancer Res. 54 (1994), 4671-4675). Ebenso korrelieren erhöhte Konzentrationen an uPAR in Lungen- (Pedersen et al., supra) und  
25 Brustkrebsgewebe (Duggan et al., Int. J. Cancer 61 (1995), 597-600; Ronne et al., Breast Cancer Res. Treat. 33 (1995), 199-207) sowie bei Magenkrebs sowohl im Tumorgewebe selbst (Heiss et al., J. Clin. Oncol. 13 (1995), 2084-2093) als auch bei den ins Knochenmark ausgestreuten  
30 Tumorzellen (Heiss et al., Nature Medicine 1 (1995), 1035-1039) mit einer schlechten Prognose.

Der Einsatz von synthetischen uPA-Inhibitoren bietet die Möglichkeit, die Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Allerdings ist die Entwicklung spezifischer uPA-Inhibitoren mit Schwierigkeiten behaftet, da der Plasminogenaktivator von Gewebetyp (tPA) eine identische Spezifität für die Spaltung der Peptidbindung Arg560/Val561 von Plasminogen aufweist. In den meisten Fällen hemmen daher niedermolekulare uPA-Inhibitoren auch tPA und damit auch tPA-vermittelte Fibrinolyse. Außerdem muß gewährleistet sein, daß synthetische uPA Inhibitoren keine starke Hemmung von Plasmin zeigen.

Trotz dieser Einschränkungen sind einige Hemmstoffe bekannt, die eine gewisse Spezifität gegenüber uPA, jedoch geringe inhibitorische Kapazität besitzen, wie etwa Benzamidin- und  $\beta$ -Naphthamidin-Derivate, wobei die wirksamste Verbindung uPA mit  $K_i = 2,2 \mu\text{mol/l}$  hemmt (Stürzebecher und Markwardt, Pharmazie 33 (1978), 599), oder Amilorid mit einem  $K_i = 7 \mu\text{mol/l}$  (Vassalli und Belin, FEBS. Lett. 214 (1987), 187-191).

DE-A-30 35 086 offenbart Cyclohexancarbonsäurederivate, die inhibitorische Wirkungen auf Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin oder uPA haben. Die untersuchten Verbindungen zeigen jedoch nur eine recht geringe und darüber hinaus unspezifische uPA-Inhibierung. EP-A-0 183 271 offenbart Lysinderivate und deren Verwendung als Proteaseinhibitoren. Es wird auch ein Benzamidino-Lysinderivat (Verbindung 108) beschrieben, das in vitro eine uPA-Hemmung, jedoch auch eine vergleichbare Wirkung auf andere Proteasen wie Trypsin oder Plasma-Kallikrein aufweist. WO 95/17885 offenbart niedermolekulare Polypeptide als uPA-Inhibitoren.

Eine weitere Klasse von bekannten uPA-Inhibitoren stellen 4-substituierte Benzothiophen-2-carboxamide mit einem  $K_i = 0,16 \text{ mmol/l}$  im Falle von Benzothiophen-623 dar (Towle et al., Cancer Res. 53 (1993), 2553-2559). Diese Hemmstoffe haben eine signifikant höhere Affinität für uPA im Vergleich zu tPA und Plasmin. Auch uPAR-gebundenes uPA wird mit hoher

Effizienz gehemmt. Ein Nachteil dieser Substanzen liegt allerdings darin, daß die chemische Synthese kompliziert ist und kaum Möglichkeiten für die Modifizierung der Struktur vorhanden sind, bzw. bisher gezeigt werden konnte.

5 Die Entwicklung weiterer Hemmstoffe von uPA ist daher für die weitere Aufklärung der Rolle von uPA und uPAR bei verschiedenen Krankheiten, speziell bei der Tumorausbreitung und Metastasierung, von großem Nutzen.

10  $N\alpha$ -Arylsulfonyl- und  $N\alpha$ -Arylsulfonyl-amino-acyl-Derivate des 3-Amidinophenylalanins sind als selektive Hemmstoffe von Thrombin (Markwardt et al., Thromb. Res. 17 (1980), 425-431) bzw. von Gerinnungsfaktor Xa (Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54 (1989), 245-252) bekannt. Auch in WO 92/08709, WO 94/18185 und WO 96/05189 wird die Verwendung von Amidinophenylalaninderivaten als Hemmstoffe für die Blutgerinnung, 15 insbesondere als Hemmstoffe für Thrombin, offenbart.

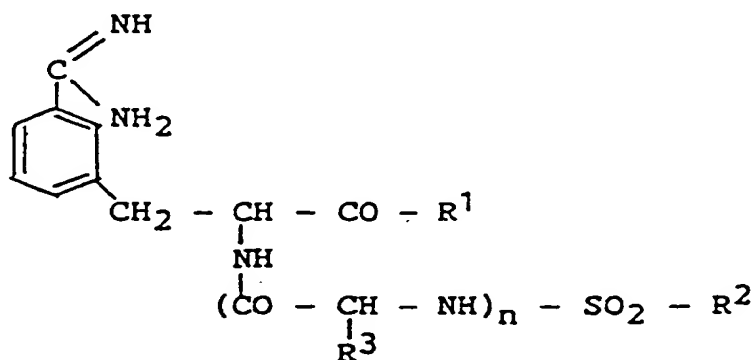
Intensiv wurden Piperidide und Piperazide des 3-Amidinophenylalanins untersucht, unter denen auch Leitstrukturen zur Hemmung fibrinolytischer Enzyme gefunden wurden (Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhibition 9,87- 20 99, 1995; Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40, 3091-3099, 1997). Während bei Stürzebecher et al. (1995) nur eine Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Trypsin beschrieben ist, finden sich bei Stürzebecher et al. (1997) auch Angaben zur Hemmung von uPA. Bei  $N\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-,  $N\alpha$ -2-(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl)sulfonyl- und 25  $N\alpha$ -2-Campher-10-yl-sulfonyl-substituierten 3-Amidinophenylalaninpipe-raziden wird für uPA ein  $K_i$ -Wert von 28 bis 140  $\mu\text{mol/l}$  gefunden, der um drei Größenordnungen höher als die Inhibitionskonstante für Thrombin ist. Somit konnte nicht davon ausgegangen werden, daß 3-Amidinophenylala- ninderivate als Urokinaseinhibitoren geeignet sind.

30

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß an Position 2 mit einem Phenylrest substituierte 3-Amidinophenylalaninderivate selektive und in vivo

wirksame Hemmstoffe von uPA darstellen. Weiterhin wurde gefunden, daß diese Substanzen eine hohe Selektivität für Lymphgewebe aufweisen und sich daher als Mittel zum Targeting von Lymphzellen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Erkrankungen des Lymphgewebes wie etwa Lymphomen eignen.

Die vorliegende Erfindung betrifft von 3-Amidinphenylalanin abgeleitete neue Urokinase-Inhibitoren der allgemeinen Formel I,



I

die als Racemate sowie als L- bzw. D-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl ist,

(b) eine Gruppe der Formel  $\begin{array}{c} \text{R}^5 \\ \diagup \\ \text{--- N ---} \\ \diagdown \\ \text{R}^6 \end{array}$  darstellt, in welcher R<sup>5</sup> und

R<sup>6</sup> beliebige mit der Gesamtstruktur kompatible Reste sind, wobei insbesondere

- (i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,
- (ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-

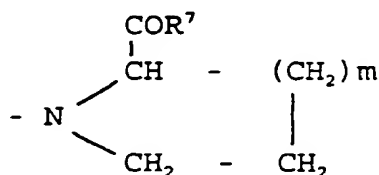


- 7 -

Alkyl, Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> Cycloalkyl ist,

- (iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder
- (iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,
- (v) R<sup>5</sup> H oder ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl ist und R<sup>6</sup> der Rest einer Aminosäure, z.B. einer α-, β- oder ω-Aminocarbon- oder Aminosulfonsäure, oder der Rest eines Peptids z.B. mit einer Länge bis zu 50 Aminosäuren oder eines Polypeptids z.B. mit einer Länge von mehr als 50 Aminosäuren bis 1000 Aminosäuren ist,

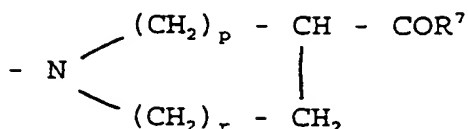
(c) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und R<sup>7</sup> die Bedeutung von R<sup>1</sup> in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

- 8 -

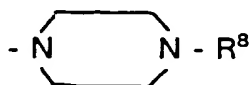
(d) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist,

(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 z.B. mit einem  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl-,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy- oder Hydroxylrest substituiert ist, wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring, vorzugsweise Phenyl oder Cyclohexyl, in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ancondensiert ist,

(f) eine Gruppe der Formel

darstellt, in welcher  $R^8$ 

- (i) einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl- oder Arylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Naphthyl,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxyrest oder

- 9 -

- (iii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenoxy- bzw. Benzylloxycarbonylrest bedeutet,

5

- (g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X

- (i) H, einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten, unverzweigten oder verzweigten Alkylrest, vorzugsweise einen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylrest, insbesondere Methyl,

10

- (ii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Thienyl oder

15

- (iii) einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Cycloalkylrest, vorzugsweise einen C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-Cycloalkylrest bedeutet,

20

- (h) einen Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls z.B. mit einem Halogenatom, einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Hydroxy-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfonyl- oder Nitrogruppe substituiert ist,

25

- (i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R", einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R" oder einen Essigsäureamidrest -CH<sub>2</sub>-CONR'R" darstellt, wobei

- (i) R' und R" H sind,  
(ii) R' und R" jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,  
(iii) R' H ist und R" C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,  
(iv) R' H ist und R" Aryl, z.B. Phenyl, ist oder

30

- 10 -

(v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom z.B. N, O oder/und S tragen kann, bilden,

5 (j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y

(i) ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, vorzugsweise Methyl, Trifluormethyl, Trichlormethyl,

10 (ii) ein gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes Aryl oder Heteroaryl, wie z.B. Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-Trimethyl-phenyl, 2,2-Dimethyl-6-methoxy-chromanyl, 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chromanyl, Anthrachinonyl, Naphthyl oder Chinolyl, bzw. O-Aryl, vorzugsweise O-Phenyl, oder O-Heteroaryl oder

15 (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,

20 (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der ggf. z.B. mit einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Halogen-, Hydroxyl- oder/und Oxogruppe substituiert ist,

25 (l) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Heteroarylrest, wie z.B. Pyridyl oder Pyrimidyl, oder heterocycloaliphatischen Rest, beispielsweise N-Methylpiperidyl darstellt,

30

- 11 -

(m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel  $-(CH_2)_n-X$  darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist,  $n = 1$  bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X

- (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine  $C_1-C_4$ -Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, z.B. Phenyl,  $C_1-C_4$ -Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl,  $(C_1-C_6)$ , substituiert ist,
- (ii) ein Halogenatom bedeutet,
- (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel  $-N(Alk)_2$  darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-Atome sowie vorzugsweise die gleiche Bedeutung besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, z.B. N, O oder/und S tragen kann, angehört,

$R^2$  einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1-C_6$ -Alkyl,  $C_1-C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenylrest, wie beispielsweise Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl darstellt,

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1-C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

Die Verbindungen können auch als Salze vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z.B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride, oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen.

Von den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Verbindungen sind solche, bei denen  $R^1$  einer Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) entspricht,  $R^2$

einen einfach, zweifach oder dreifach alkylsubstituierten Phenylrest, insbesondere einen 2,4,6-substituierten Phenylrest, z.B. einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt und  $n = 0$  ist, von besonderer Bedeutung.

- 5 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie z.B. in WO 92/08709 und WO 94/18185 beschrieben, hergestellt und auf ihre biologische in vitro Aktivität gesetzt werden.

(L)-, (D)- oder (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid wird mit  
10 einem entsprechenden Sulfochlorid oder einer sulfonylierten Aminosäure bzw. deren Halogenid in Gegenwart einer Base zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I mit Cyanfunktion, in der  $R^1 = OCH_3$  ist und  $R^2$  sowie  $R^3$  und  $n$  den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Bedeutungen entspricht, umgesetzt. Durch milde saure oder alkalische Hydrolyse sind  
15 daraus die Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Carbonsäurestruktur ( $R^1 = -OH$ ) erhältlich, deren Veresterung mit einem entsprechenden Alkohol unter säurekatalytischen Bedingungen zu Verbindungen der allgemeinen Formel I führt, wobei  $R^1 = (a)$  bedeutet. Nach einem in der Peptidchemie üblichen Verfahren, z.B. DCC-Verfahren in Gegenwart von HOBt, sind durch  
20 Umsetzung der Carbonsäuren der allgemeinen Formel I ( $R^1 = -OH$ ) mit einem Nukleophil der Strukturen (b), (e) und (f) die Verbindungen mit entsprechendem  $R^1$  der allgemeinen Formel I vorstellbar. Für die Synthese von Verbindungen mit  $R^1 = (c)$  und (d) werden zunächst die Carbonsäuren der allgemeinen Formel I mit  $R^1 = OH$  mit cycloaliphatischen Aminosäureestern der Strukturen (c) und (d), wobei  $R^7$  vorzugsweise  $-OCH_3$  bzw.  $-OC_2H_5$   
25 bedeutet, umgesetzt, die erhaltenen Carbonsäurester unter milden sauren oder alkalischen Bedingungen zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysiert, die nachfolgend in bereits beschriebener Weise verestert oder mit Nukleophilen der Struktur (b), (e) und (f) umgesetzt werden können,  
30 wobei Verbindungen der allgemeinen Formel I mit  $R^1 = (c)$  sowie (d) und  $R^7 = (a)$ , (b), (e) und (f) erhalten werden.

- 13 -

Die Zielverbindungen der allgemeinen Formel I mit Amidinstruktur sind aus den Cyanverbindungen in bekannter Weise erhältlich, wobei in der Regel durch Addition von  $H_2S$  an die Cyangruppe zunächst die Thioamide erhalten werden, die durch S-Methylierung mit Methyljodid in die Thioimidoester und anschließend durch Behandlung mit Ammoniumacetat in alkoholischer Lösung in die Amidinoverbindungen überführt werden. Außerdem können gegebenenfalls aus den Cyanverbindungen mit Methanol oder Ethanol in Gegenwart von HCl-Gas und in bestimmten Fällen eines inerten Lösungsmittels die entsprechenden Imidoesterhydrochloride dargestellt werden, deren Umsetzung in alkoholischer Ammoniaklösung zu den Amidinoverbindungen führt.

Die erfindungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit mindestens einem geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder Trägerstoff zur Herstellung von oral, subkutan oder intravenös verabreichbaren Arzneimitteln zur Tumorbekämpfung oder in der Diagnostik verwendet werden. Ebenfalls möglich ist die Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder/und Peptiden.

Die Arzneimittel zur Tumorbekämpfung bei Menschen und Tieren können topisch, oral, rektal oder parenteral, z.B. subkutan oder intravenös, in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern, verabreicht werden.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Verbindung der Formel (I) um  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid bzw. um das L-Entantiomere davon oder um ein pharmazeutisch verträgliches Salz dieser Verbindungen. Diese Substanzen haben ein gutes Löslichkeitsverhalten. In Trispuffer (pH 7,3) sind sie bis zu einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  mol/l löslich. Durch Zusatz

- 14 -

von 5% Ethanol steigt die Löslichkeit auf  $2 \times 10^{-4}$  mol/l und bei Zusatz von 5% DMSO auf  $10^{-3}$  mol/l.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, hocheffizient das Wachstum oder/und die Ausbreitung von malignen Tumoren zu hemmen, z.B. die Tumorausbreitung beim Pankreaskarzinom, das Tumorwachstum des Mammakarzinoms sowie die Metastasierung von Tumoren. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen Antitumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z.B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam (z.B. bei der Verhinderung der Blasenbildung bei der Hauterkrankung Pemphigus vulgaris).

Erfindungsgemäße uPA Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie einen mindestens zweifach, vorzugsweise mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10-fach geringeren  $K_i$ -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin und Faktor Xa zu hohe  $K_i$ -Werte haben.

Die erfindungsgemäßen Substanzen der Formel I können in Form von Konjugaten mit physiologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, z.B. mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Mitteln, z.B. Chemotherapeutika wie cis-Platin oder 5-Fluor-Uracil, oder Peptiden. Weiterhin können die Substanzen auch in die Membran von Trägervesikeln, z.B. Liposomen, eingebaut werden und somit ein Targeting von in den Trägervesikeln eingeschlossenen Wirksubstanzen, z.B. zytotoxischen Mitteln wie etwa Doxorubicin ermöglichen.



- 15 -

Eine weitere Indikation für die Substanzen der allgemeinen Formel II:



5    worin X einen beliebigen Rest, insbesondere einen organischen Rest  
darstellt, z.B. einen Rest wie für Verbindungen der Formel I definiert, aber  
auch einen anderen Rest, z.B. eine physiologisch wirksame Substanz wie  
etwa ein zytotoxisches Mittel, ein Peptid oder eine Radiomarkierung, ein  
Lipid oder ein Kohlenhydrat bedeutet, und R<sup>2</sup> eine Gruppe wie zuvor  
10    definiert bedeutet, insbesondere einen 2,4,6-dreifach substituierten  
Phenylrest, z.B. 2,4,6-Triisopropylphenyl, ist das Targeting von Lymphzel-  
len, welches aufgrund ihrer um den Faktor 10 bis 20 höheren Affinität für  
Lymphknotengewebe gegenüber anderen Gewebetypen möglich wird.  
Vorzugsweise ist R<sup>2</sup> über eine Sulfonylgruppe -SO<sub>2</sub>- mit dem Rest X  
15    verbunden. Somit eignen sich diese Substanzen hervorragend als Mittel zur  
Diagnostik oder zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, ins-  
besondere malignen Erkrankungen wie etwa Tumormetastasen und  
Lymphomen. Die Verabreichung der Substanzen kann wie zuvor bereits  
beschrieben erfolgen. Eine Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewe-  
20    bes erfolgt vorzugsweise durch eine mehrtägige Verabreichung des  
Medikaments, z.B. über einen Zeitraum von 5 bis 20 Tagen, mit einer  
anschließenden Behandlungspause und gegebenenfalls ein oder mehr-  
maligem Wiederholen der Applikation.

25    Die Erfindung soll an den folgenden Beispielen und Abbildungen näher  
erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1      das Ergebnis einer Zytotoxizitätsbestimmung einer erfindungs-  
gemäßen Substanz,

Figur 2      das Ergebnis eines Versuchs zur Inhibierung des Abbaus einer  
Fibrinmatrix durch humane Mammakarzinomzellen,

Figuren 3

und 4 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf die Ausbreitung, das Wachstum und die Metastasierung von Mammakarzinomzellen in der Ratte,

5

Figur 5 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstums eine Pankreastumors in der Ratte und

Figur 6 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstum humaner Mammakarzinomzellen in Mäusen.

10

### Beispiele

1. ***N*α-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid**

15

1.1 ***N*α-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-methylester**

20

5 g (L)-3-Cyanphenylalanin-methylester wurden in 100 ml Dioxan suspendiert, 4,45 ml N-Methylmorpholin (NMM) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 5,97 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid in fester Form wurde 3 Tage gerührt, danach ausgefallenes NMM-HCl abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel (KG) 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 8,34 g Sirup (90%).

25

1.2 ***N*α-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin**

30

8,34 g der Verbindung 1.1 wurden in einer Mischung aus je 50 ml Essigsäure und 1 N Salzsäure 8 Std. unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten 2x mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Ethylacetatlö-

- 17 -

sungen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach Reinigung über KG 60 (Chloroform) wurden 5,8 g eines festen Produktes erhalten (72%).

5     **1.3     $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid**

5,7 g der Verbindung 1.2 wurden in 100 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst, auf 0°C abgekühlt, 2,22 g  $\alpha$ -Hydroxybenzotriazol (HOBt),  
10     2,82 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 3,94 g 1-Ethoxycarbonyl-piperazin in 30 ml THF wurde über Nacht gerührt, danach ausgefallenes Dicyclohexylurea (DCU) abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über KG 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 7,1 g eines  
15     amorphen Pulvers (96%).

**1.4     $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid Hydrochlorid**

20     7,1 g der Verbindung 1.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen Triethanolamin (TEA) zugefügt, 10 min ein kräftiger Schwefelwasserstoffstrom eingeleitet und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat gelöst, die organische Phase mit 1 N  
25     Salzsäure und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. 7,2 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 250 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 17 g Methyljodid versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stengelassen. Danach wurde das  
30     Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidester-hydroiodid (8,5 g) in 50 ml Methanol gelöst, 1,9 g Ammoniumacetat zugefügt und der Ansatz 4 Std. bei 60°C erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels

- 18 -

erhaltene Rohprodukt wurde über Sephadex LH20 (Methanol) gereinigt. Das auf diese Weise erhaltene Amidin-hydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 5,3 g eines amorphen Pulvers (69%).

5

**2.  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsufonyl-(D,L)-3-amidinopenyl-alanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid**

**2.1  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-ethylester**

10

4,56 g  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanin (aus (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid und dem entsprechenden Sulfochlorid analog 1.1 und 1.2 dargestellt), 1,5 g HOBt und 2,42 g DCC wurden in 50 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt und danach 2,36 g Nipecotinsäure-ethylester zugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde ausgefallenes DCU abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und zur Kristallisation stengelassen. Der gebildete Niederschlag wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,46 g (75%).

15

20

**2.2  $N\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsufonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure**

25

4,4 g des vorher beschriebenen Ethylesters wurden in einer Mischung aus 35 ml Essigsäure und 25 ml 1 N. HCl 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde zum Erkalten stengelassen, wobei sich ein wachsartiges Produkt abschied. Nach Abgießen des Lösungsmittels wurden 200 ml Wasser zugesetzt, längere Zeit kräftig gerührt und die erhaltene feste Substanz

30

abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 3,84 g (92%).

**2.3  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid**

2,28 g der vorher beschriebenen Verbindung 0,6 g HOBt und 0,97 g DCC wurden in 20 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt, anschließend 0,6 g Benzylamin zugefügt und weiter über Nacht gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DCU wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Methanol gelöst und die Lösung in 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung/Eis gegossen. Nach 1 Std. wurde der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,48 g (94%).

**2.4  $\alpha$ -2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidino-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid**

2,4 g der Verbindung 2.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen TEA zugefügt, in die Lösung 10 min Schwefelwasserstoff eingeleitet und der Ansatz 2 Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit gesättigter Kochsalzlösung und Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. 2,38 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 100 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 6,5 g Methyljodid versetzt und 20 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidonester-hydroiodid in 50 ml Methanol gelöst, 0,5 g Ammoniumacetat zugegeben und der Ansatz 4 Std. bei 60°C im Wasserbad erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt konnte über KG

- 20 -

60 gereinigt werden. Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform, danach mit Chloroform/Methanol 9:1. Das so gereinigte Amidinhydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 1,45 g eines amorphen Pulvers (56%).

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch, eine Reinheitsprüfung erfolgte mittels DC und HPLC.

### 3. In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I

Konfiguration	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	K <sub>i</sub> , $\mu\text{mol/l}$
L	-N N-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	TIPP	0	0,41
D,L	-N N-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	TIPP	0	0,96

Abkürzungen: TIPP - 2,4,6-Triisopropylphenyl

#### Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden 200  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend, 0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol pH 8,0), 25  $\mu\text{l}$  Substrat (Pefachrome UK oder Bz- $\beta$ Ala-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O; Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz) und 50  $\mu\text{l}$  sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach Dixon durch lineare

- 21 -

Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die  $K_i$ -Werte sind das Mittel aus mindestens 3 Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%.

4. In vitro Hemmung verschiedener Serinproteasen vom Trypsin-Typ durch (N $\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (uPA-Inhibitor) und N $\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-N'-methyloperazid (Naphthylsulfonyl-Derivat) als Vergleich

Enzym	K <sub>i</sub> [μmol/l]	
	uPA-Inh.	Naphthylsulfonyl-Der.
Urokinase	0,41	150
Plasmin	0,39	55
Sc-tPA	4,9	430
Thrombin	0,49	0,036
Faktor Xa	1,7	30
Faktor XIIa	13	> 1000
Plasma-Kallikrein	7,2	85
Glandulär-Kallikrein	> 1000	> 1000
Trypsin	0,037	1,3
Tryptase	6,3	33

Die Bestimmung der Hemmwirkung für die verwendeten Enzyme erfolgte nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Prinzip.

Aus den oben angegebenen Werten ist ersichtlich, daß der erfindungsgemäße Urokinasehemmstoff uPA-Inhibitor überraschenderweise einen um mehr als den Faktor 10 kleineren  $K_i$ -Wert für Urokinase als für Einzelketten tPA (Sc-tPA) aufweist. Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen als selektive Urokinaseinhibitoren. Zum Vergleich ist die Inhibitor-

- 22 -

aktivität des Naphthylsulfonyl-Derivats angeführt, das eine signifikant geringere in vitro Anti-uPA-Aktivität aufweist.

## 5. Bestimmung der Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Zellproliferation/Zytotoxizität wurde ein kommerziell erhältlicher Test eingesetzt (Promega), welcher auf der zellulären Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes beruht. Das aus dieser Reaktion resultierende farbige Produkt kann mittels eines ELISA-Spektrometers (ICN-Flow) quantifiziert werden. Der synthetische Inhibitor (offene Kreise) hatte gegenüber dem Lösungsmittel (geschlossene Kreise) alleine keinen Einfluß auf das Zellwachstum humaner Orvarialkarzinomzellen OV-MZ-6 (Figur 1). Somit ist der erfindungsgemäße uPA-Inhibitor in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen bis 40  $\mu$ M nicht zytotoxisch.

## 6. Inhibierung des Abbaus einer Fibrin-Matrix durch humane Mammakarzinomzellen

Zur Untersuchung der Fähigkeit von Tumorzellen eine extrazelluläre Matrix abzubauen, wurde ein Fibrinmatrixabbau-Test entwickelt und verwendet. Je größer die proteolytische Aktivität der Tumorzellen, um so höher ist die Konzentration der Fibrinabbauprodukte im Matrixüberstand. Der Matrixabbaukapazität entspricht der Konzentration der Fibrinabbauprodukte, welche mittels ELISA (D-Dimer) ermittelt werden.

Die Fibringlele wurden in 24 Well Kulturplatten aus 200  $\mu$ l Fibrinogen (50 mg/ml) in PBS (pH 7,4) durch 50  $\mu$ l Thrombin (10 U/ml) und 50  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  (150 mM) pro Well nach Inkubation für 30 min bei 37°C gebildet.  $2 \times 10^5$  Mammakarzinomzellen wurden auf diese Fibrinmatrix in 1 ml DMEM Kulturmedium, plus 10% fetalem Kälberserum und 2  $\mu$ g Glu-Plasminogen ausgesät und 4 h lang inkubiert. Danach wurde der Überstand zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und die Fibrinabbauprodukte mittels ELISA



quantifiziert. Die Zugabe des erfindungsgemäßen Inhibitors (A) in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Inhibierung des Matrixabbaus durch Mammakarzinomzellen im Vergleich zu dem Naphthyl-Derivat (B), das keine Hemmung des Fibrinabbaus durch Mammakarzinomzellen zeigt (Figur 2).

## 7. In vivo Test des uPA Inhibitors auf Tumorausbreitung, Tumorstadium und Metastasierung in der Ratte

### A) Brustkrebs-Modell

10-25 mm<sup>3</sup> Rattenbrustkrebs-Tumorfragmente BN-472 wurden subkutan orthotropisch unter die Fettpolster der Brustdrüse in 6 bis 7 Wochen alten, weiblichen Brown Norwegian Ratten transplantiert (Tag 0). Die Behandlung der Tiere wurde 24 h nach der Tumordinokulation intraperitoneal begonnen. Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt nur Injektionslösung (100 µl einer 10% Ethanol/Saline (0,9% NaCl) Lösung). Der Vergleichsgruppe des Naphthyl-Derivats (B) und der Therapiegruppe des erfindungsgemäßen uPA-Inhibitors (A) wurden in der oben genannten Lösung eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht täglich i.p. verabreicht. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt.

Die Abmessungen der subkutanen Tumoren und die Gewichte der Tiere wurden wöchentlich bestimmt. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere getötet und Tumorgewichte, Organgewichte und die Anzahl von Metastasen in relevanten Geweben bestimmt.

Die Behandlung mit uPA-Inhibitor (A) führte zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorgewichtes sowie der axillären Lymphknoten ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,005$ ) im Vergleich mit dem Naphthyl-Derivat (B) und Kontrollgruppen ohne Inhibitor (Fig. 3 und 4). Die Gewichte

- 24 -

von Lunge, Leber, Niere und Milz bei den mit dem uPA-Inhibitor behandelten Tieren waren unverändert gegenüber den Kontrolltieren.

## **B) Pankreaskarzinom-Modell**

5

Fragmente des transplantierbaren und metastasierenden Pankreasadenokarzinoms CA20948 der Ratte wurden aus Donortieren explantiert. Nach Zellvereinzellung wurden gleiche Mengen an suspendierten Tumorzellen zusammen mit 2 mg Matrigel jedem der Empfänger-  
10 Tiere, männlichen 10 Wochen alten Lewisratten (n=9), subkutan implantiert. Die Durchführung der Behandlung sowie Zusammensetzung der Therapiegruppen war identisch wie unter A).

15

Wie aus Figur 5 ersichtlich ist, findet man beim erfindungsgemäßen uPA-Inhibitor (offene Kreise) gegenüber dem Naphthyl-Derivat (geschlossene Kreise) und der Kontrollgruppe (Dreiecke) eine signifikante Verringerung des Tumorgewichts und eine Verminderung des Wachstums bei den entstehenden Ratten-Pankreaskarzinom.

20

## **C) Wiederholung der Versuche mit geänderter Applikationsart**

25

Die in den Abschnitten A und B beschriebenen Versuche wurden mit geänderter Applikationsart des Inhibitors wiederholt. Dabei wurde ohne Veränderung der täglichen Dosis der Inhibitor im Mammakarzinom-Modell subkutan (n=9) und im Pankreasadenokarzinom-Modell intraperitoneal (n=8) appliziert. Die Ergebnisse dieser Wiederholungsversuche entsprachen in Tendenz und Umfang den bereits dargestellten Ergebnissen.

30

**D) Zusammenfassung der Ergebnisse**

In allen Versuchen wurde durch Behandlung mit dem Inhibitor eine erhebliche Reduktion der TumorgroÙe bzw. des Tumorgewichts und der Anzahl bzw. der Masse von Tochtergeschwülsten im Vergleich zu den Kontrollgruppen erreicht. Im Mammatumor-Modell waren in der Inhibitor-behandelten Gruppe, die mittleren Tumorgewichte am Ende der Behandlung auf 23% (i.p.) bzw. 37% (auf s.c.) im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrolle reduziert. Die Anzahl der Lungenfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen waren auf 9% (i.p.) bzw. 32% (s.c.) und die mittleren Gewichte der axillären Lymphknoten auf 27% (i.p.) bzw. 48% (s.c.) reduziert.

Im Pankreastumor-Modell waren die Massen des tumorhaltigen Pankreas in den Inhibitor-behandelten Gruppen um 76% (i.p.) bzw. 34% (s.c.), die Massen der subkutanen Tumoren um 54% (i.p.) bzw. 60% (s.c.) verglichen mit den jeweiligen Vehikel-behandelten Gruppen reduziert. Die Anzahl detektierter Leberfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen war 29% (i.p.), bzw. 2% (s.c.) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen.

Die Entwicklung der Körpergewichtszunahme und der Vergleich der Organgewichte zwischen Inhibitor- und Vehikel-behandelten Gruppen lieÙen keine Hinweise für eine etwaige erhebliche Toxizität des Inhibitors unter den beschriebenen Bedingungen erkennen.

**8. Behandlung humaner Brustkrebszellen in der Nacktmaus**

Um die in vivo Effizienz des Inhibitors zur Hemmung des Tumorwachstums humaner Mammakarzinomzellen zu testen (MDA-BA-231), wurden  $6 \times 10^6$  Zellen subcutan in die rechte Flanke von Balb/c Nacktmäusen (4-6 Wochen alt) injiziert. Die Tumorzellen wurden vor Inokulation mit dem synthetischen

uPA-Inhibitor vorinkubiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit einer Dosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal wie unter A) beschrieben zweimal wöchentlich behandelt. Die Tumorgroße wurde wöchentlich durch Messung der zwei größten Durchmesser bestimmt.

5

Wie aus Figur 6 ersichtlich ist, nimmt das Tumolvolumen bei der Verabreichung des uPA-Inhibitors (offene Kreise) signifikant langsamer zu als in der Kontrollgruppe (geschlossene Kreise) wo Ethanol in Saline verabreicht wurde.

10

#### 9. Die Biodistribution des Inhibitors in der Ratte

Die Biodistribution des Inhibitors wurde in zwei unabhängigen Versuchen in Gewebeaufschlüssen von Ratten ermittelt, die 5 bzw. 10 Tage lang täglich einmal mit 1 mg/kg Inhibitor i.p. behandelt worden waren. Zum Aufschluß wurden jeweils 100 mg Gewebe mechanisch zerkleinert und mit 200  $\mu$ l 1% Triton X-100 in physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Nach Zugabe von 400  $\mu$ l Ethanol wurde der Aufschluß 1 min mit Ultraschall behandelt. Der Gewebeextrakt wurde 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Zur Vorreinigung wurde der Überstand auf eine mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser equilibrierte C18-Silica Reversed Phase Vorsäule (Sep-Pak® cartridge C18, 1 ml Waters, Eschborn, Deutschland) aufgetragen, hintereinander mit 2 x 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 10% Methanol, 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 5% Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure und 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 500  $\mu$ l 75 % Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure eluiert. Die HPLC-Analytik wurde auf einer Reversed Phase C18 Silica Säule mit einem 5-55%igen Acetonitril Gradienten mit 0,04% Perchlorsäure durchgeführt.

Die Konzentrationen des Inhibitors in den jeweils untersuchten Gewebetypen ( $\mu$ g/g) sowie in Blutplasma und Galle ( $\mu$ g/ml) und zum Vergleich eines entsprechenden Naphthylsulfonylderivats sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

30

Tabelle

Verteilungsprofil einer erfindungsgemäßen Substanz in verschiedenen Geweben bzw. Blutplasma und Galle im Vergleich zu einem Naphthylsulfonyl-Derivat (N $\alpha$ -2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid)

Gewebe	Gehalt ( $\mu$ g/g)		
	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 5 Tage	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 10 Tage	Naphthylsulfonyl- Derivat 1 mg/kg i.p., 5 Tage
Milz	2,02	2,48	0,089
Leber	2,85	2,08	0,12
Niere	2,67	2,48	0,085
Muskel	0,74	< 0,5	0,008
Fett Niere	0,82	1,0	< 0,005
Herz	<0,5	1,09	0,59
Lunge	3,70	1,81	0,020
Gehirn	<0,5	<0,5	
Lymphknoten Trachea	7,45	16,38	0,12
Lymphknoten Achsel	1,97	2,74	<0,005
Lymphknoten Knie	7,83	3,8	<0,005
Gehalt ( $\mu$ g/ml)			
Plasma	0,008	0,035	0,004
Galle	1,96	1,75	0,097

In den meisten untersuchten Gewebetypen lag nach 5 bis 10 Tagen der Inhibitor in einer Größenordnung von 1 bis 3  $\mu$ g/g vor. Die Plasmakonzentrationen des Inhibitors lagen 24 h nach der jeweils letzten i.p. Applikation jeweils ein bis zwei Größenordnungen unter den mittleren Gewebekonzen-

- 28 -

trationen. Daraus kann auf eine hohe Affinität für Gewebe und eine niedrige Plasmaeiweißbindung geschlossen werden. Die Konzentrationen des im Vergleich über 5 Tage applizierten Naphthylsulfonyl-Derivats waren in den verschiedenen Geweben 20-30 fach geringer.

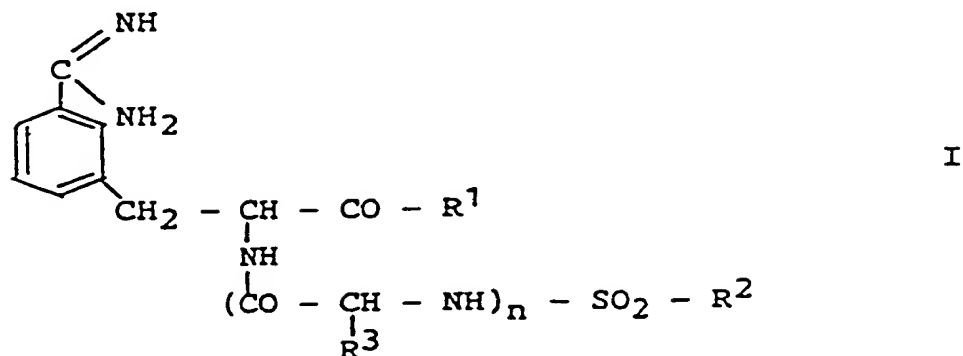
5

10

Der Inhibitor zeigt eine auffallende Anreicherung in den Lymphknoten. In den unabhängigen Versuchen wurden in trachealen Lymphknoten nach 5-tägiger Applikation Konzentrationen 5,3 bzw. 7,5  $\mu\text{g/g}$ , nach 10-tägiger Applikation 21,6 bzw. 16,4  $\mu\text{g/g}$  gemessen. Da Tumorzellen sich regelmäßig über lymphatische Bahnen disseminieren, ist die spezifische Anreicherung des Inhibitors in den Lymphgefäßen von Bedeutung und Vorteil für dessen Einsatz als anti-metastatisches Therapeutikum.

## Ansprüche

## 1. Verwendung von Verbindungen der Formel I



die als Racemate sowie als D- oder L-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

15 R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl ist,

(b) eine Gruppe der Formel -N  $\begin{matrix} \diagup \text{R}^5 \\ \diagdown \text{R}^6 \end{matrix}$  darstellt, in welcher R<sup>5</sup>

20

und R<sup>6</sup> beliebige Reste sind, wobei insbesondere

- (i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,
- (ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, Aralkyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> Cycloalkyl ist,
- 25 (iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder
- (iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,
- 30

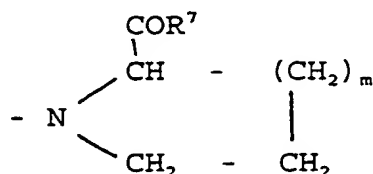
- 30 -

- (v)  $R^5$  H oder ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - $C_4$  Alkyl ist oder  $R^6$  der Rest einer Aminosäure, eines Peptids oder eines Polypeptids ist,

5

- (c) eine Gruppe der Formel

10

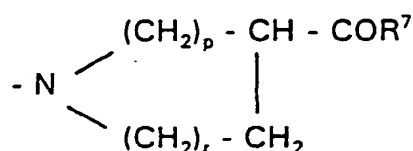


darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist,

15

- (d) eine Gruppe der Formel

20



darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist.

25

30

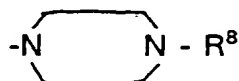
- (e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 substituiert ist,



- 31 -

wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ankondensiert ist,

(f) eine Gruppe der Formel



darstellt, in welcher  $\text{R}^8$

- (i) einen gegebenenfalls substituierten  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkyl- oder Arylrest,
  - (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkoxyrest oder
  - (iii) einen gegebenenfalls substituierten Phenoxy- bzw. Benzyloxycarbonylrest bedeutet,
- (g) einen Acylrest der Formel  $\text{-COX}$  darstellt, wobei X
- (i) H, einen gegebenenfalls substituierten unverzweigten oder verzweigten Alkylrest,
  - (ii) einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, oder
  - (iii) einen gegebenenfalls substituierten Cycloalkylrest bedeutet,
- (h) einen Aralkylrest darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls substituiert ist,
- (i) einen Carbonsäureamidrest der Formel  $\text{-CONR}'\text{R}''$ , einen Thiocarbonsäureamidrest  $\text{-CSNR}'\text{R}''$  oder einen Essigsäureamidrest  $\text{-CH}_2\text{-CONR}'\text{R}''$  darstellt, wobei
- (i)  $\text{R}'$  und  $\text{R}''$  H sind,

- 32 -

- 5
- (ii) R' und R" jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,
  - (iii) R' H ist und R" C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,
  - (iv) R' H ist und R" Aryl ist, oder
  - (v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom tragen kann, bilden,
- 10
- (j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y
    - (i) ein gegebenenfalls substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl,
    - (ii) ein gegebenenfalls substituiertes Aryl oder Heteroaryl bzw. O-Aryl oder O-Heteroaryl, oder
    - (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,
- 15
- (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der gegebenenfalls substituiert ist,
- 20
- (l) einen gegebenenfalls substituierten Heteroarylrest oder heterocycloaliphatischen Rest darstellt,
- 25
- (m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist, n = 1 bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X
    - (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), substituiert ist,
    - (ii) ein Halogenatom bedeutet,
    - (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel -N(Alk)<sub>2</sub> darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-
- 30

- 33 -

Atome besitzen und das Stickstoffatom gegebenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, S tragen kann, angehört,

5

$R^2$  einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

10

oder von Salzen der Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokinaserezeptor-assoziierten Krankheiten.

15

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^1$  eine Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) ist,  $R^2$  einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt, und  $n=0$  ist.

20

3. Verwendung nach Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel I  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantiomer oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen ist.

25

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen in Form von physiologisch verträglichen Säuresalzen, insbesondere als Hydrochloride, vorliegen.

30

- 34 -

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Tumorbekämpfung.
6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Bekämpfung von Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und der Metastasenbildung.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Bekämpfung von Pemphigus vulgaris.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der Formel I als Konjugate mit weiteren pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen als Konjugate mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Substanzen eingesetzt werden.
10. Verwendung von Verbindungen der Formel II
- $$X-R^2$$
- worin
- X einen beliebigen Rest darstellt und
- $R^2$  einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,
- oder von Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für das Targeting von Lymphzellen.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin  $R^2$  ein 2,4,6-dreifach substituiertes Phenylrest, insbesondere 2,4,6-Triisopropyl ist.
12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11 zur Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes.

- 35 -

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Bekämpfung von Lymphomen und der Metastasenbildung.
- 5 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung von oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern.
- 10 16. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens eines Urokinaseinhibitors nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 15 17. Verfahren zum Targeting des Lymphgewebes bei Lebewesen, insbesondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 10 bis 11.
- 20 18.  $N\alpha$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantioner davon oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen.

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenyl-  
alanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und  
5 der Metastasierung.

10

vo 20. Juli 1999

Fig 1

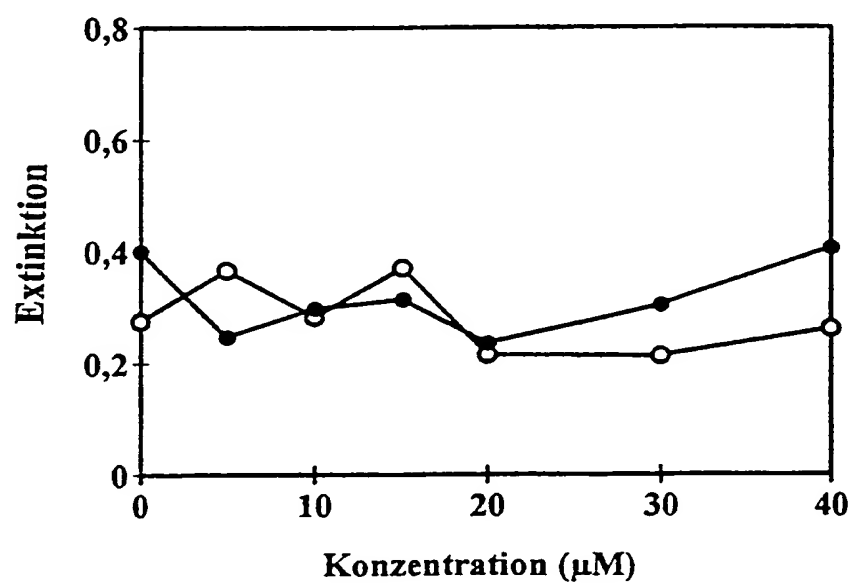


Fig 2

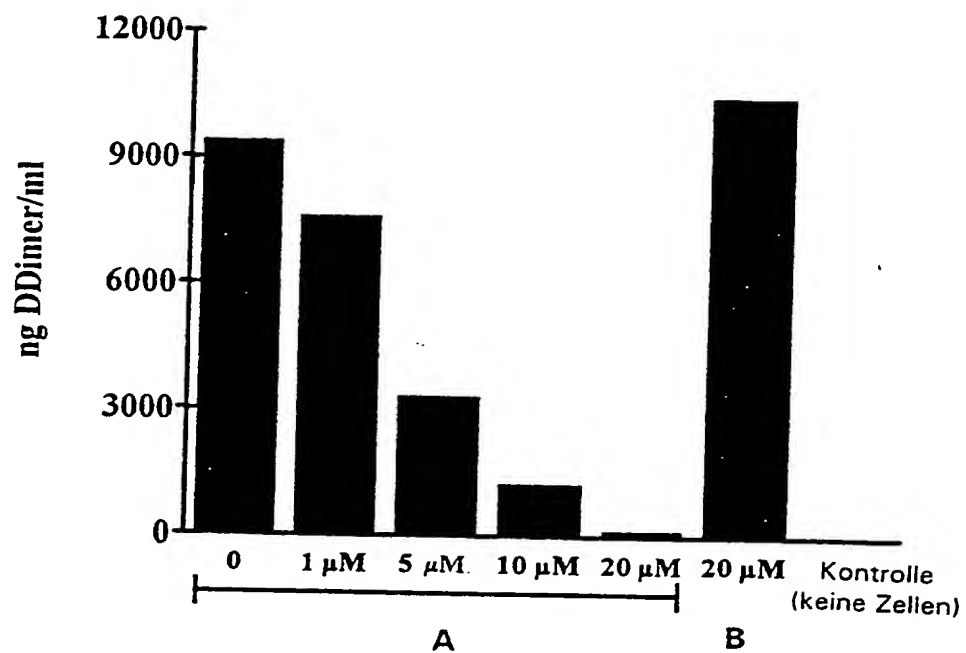




Fig 3

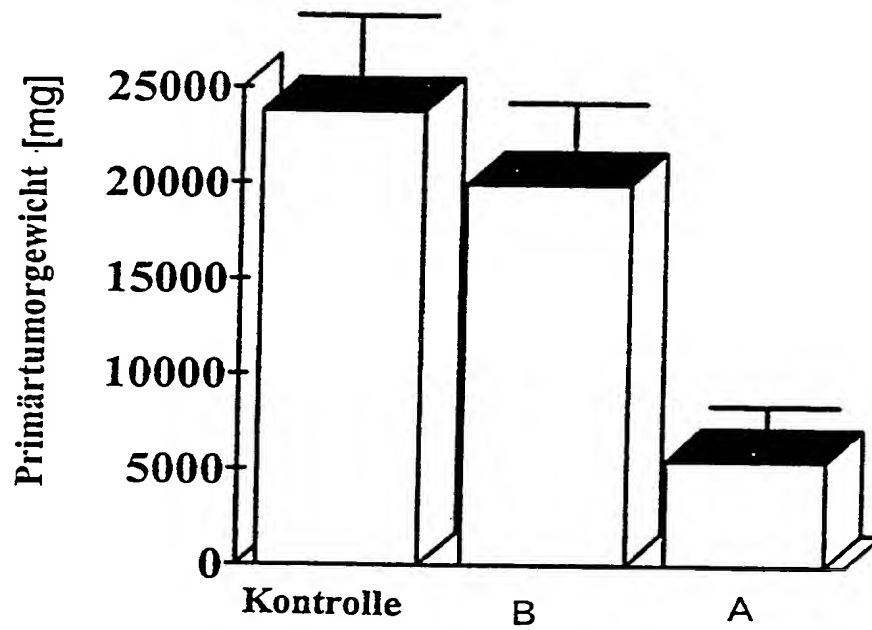


Fig 4

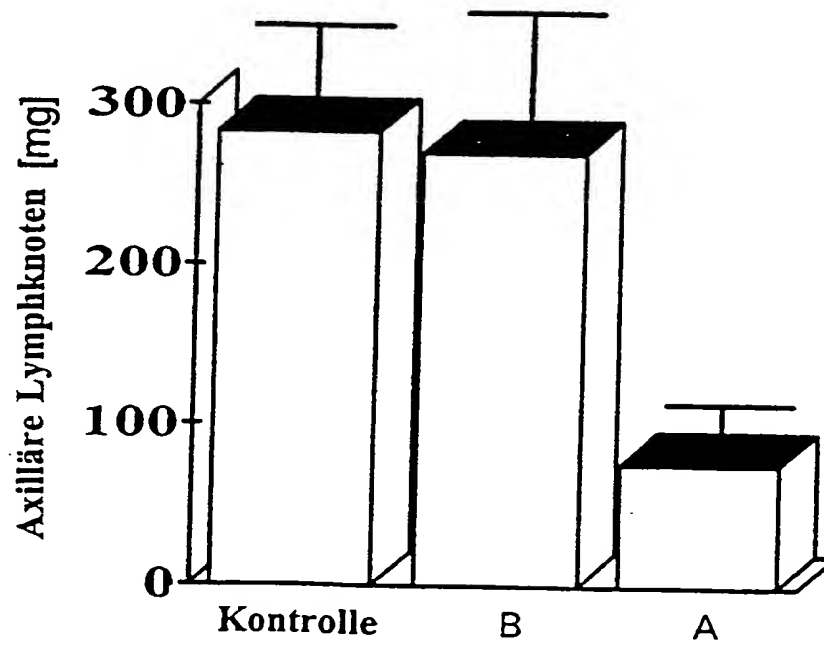


Fig 5

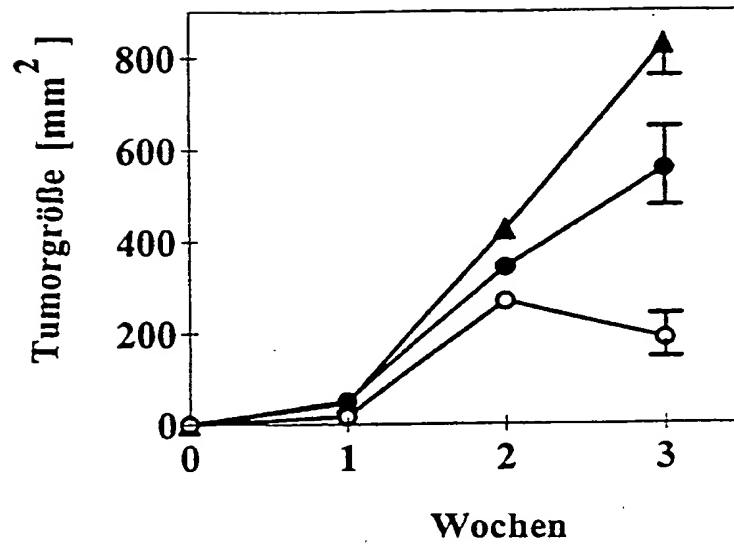
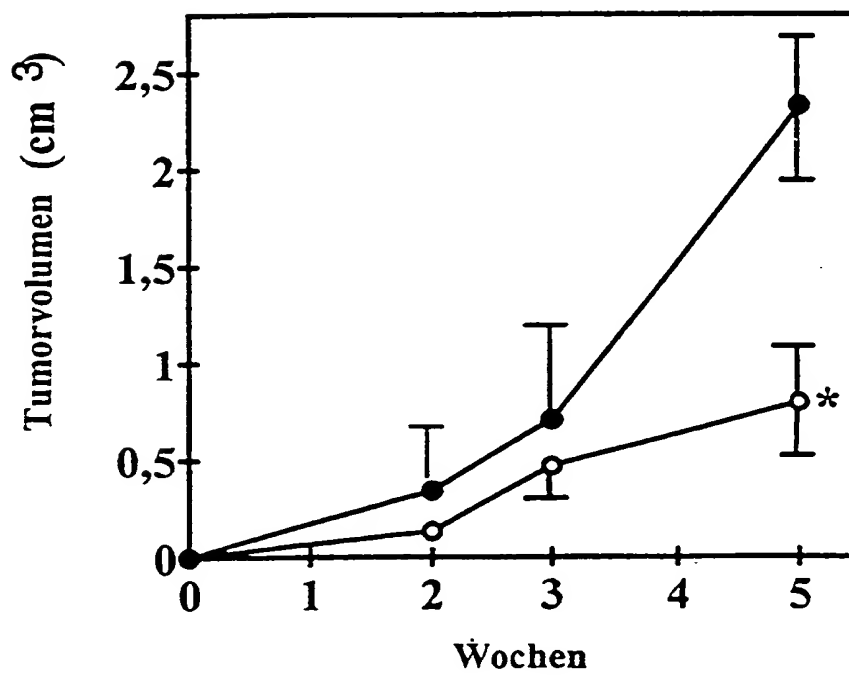


Fig 6



\* p = 0,014

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 02 NOV 2000

WIPO

PCT



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 18061P WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05145	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/07/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K31/495		
Anmelder WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et.al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  04/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  02.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Herrera, S  Tel. Nr. +49 89 2399 8464  

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-28                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-18                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/4-4/4                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 16.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 16 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

**siehe Beiblatt**

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

#### **IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☒ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
- siehe Beiblatt**
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- ☐ alle Teile.
- ☒ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. 1-9,14-16,18 beziehen.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9,14-16,18
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-9,14-16,18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	18
	Nein: Ansprüche	1-9,14-16

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt III**

Der Anspruch 16 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieses Anspruchs kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

**Zu Punkt IV**

Die vorliegende internationale Anmeldung enthält mehrere (Gruppen von) Erfindungen:

1. Ansprüche: 1-9, 14-16, 18

Verwendung von Verbindungen der Formel I zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokinaserezeptor-assoziierten Krankheiten

2. Ansprüche: 10-13, 18

Verwendung von Verbindungen der Formel II zur Herstellung eines Mittels für das Targeting von Lymphzellen.

A) Formel II ist viel breiter als Formel I und eigentlich nur als Phenylrest definiert.

Die Verbindungen der Formel II weisen die wesentlichen strukturellen Merkmale der Formel I nicht auf.

B) Außerdem sind die beanspruchten Verwendungen nicht durch ein gemeinsames Konzept verbunden (Targeting von Lymphzellen hat nichts mit Urokinase-assoziierten Krankheiten zu tun).

Beide oben genannten Gründe sind auch jede für sich genommen genügend, um die Einheitlichkeit zu verneinen (Regel 13(1) PCT).

**Zu Punkt V**

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1 WO 96 05189 A

D2 WO 92 08709 A

D3 WO 94 18185 A

D4 EP 0 183 271 A

D5 DE 30 35 086 A

D6 WO 95 17885 A

2. Die Verbindungen die in der vorliegende Anmeldung verwendet werden sind aus D1 bis D3 als Thrombin und/oder Trypsin Inhibitoren bekannt.

Aus D4 und D5 geht hervor, daß Inhibitoren von Thrombin und/oder Trypsin sehr oft auch Urikinasinhhibitoren sind.

Es muss also als naheliegend betrachtet werden, daß die in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Verbindungen auch Urokinase inhibieren.

Aus D6 ist bekannt daß Tumoren und vor allen die Bildung von Metastasen mit Hilfe von Urokinasinhhibitoren verhindert werden können.

Der Gegenstand der vorliegende Anmeldung fehlt daher die notwendige erfinderische Tätigkeit (Art 33 (3) PCT).

3. Die beanspruchte Verbindung (Anspruch 18) ist im Vergleich mit dem Stand der Technik neu. Sehr ähnliche Verbindungen sind aber aus D1 bekannt, mit dem gleichen Aktivität. Die Verbindung kann daher nicht als erfinderisch angesehen werden (Art 33 (3) PCT).
4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden



Ansprüche 1-9 und 14-16 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

## PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**  
**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL**  
**OF COPIES OF TRANSLATION**  
**OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY**  
**EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

**Weickmann**

19. FEB. 2001

WEICKMANN, H.  
 Kopernikusstrasse 9  
 D-81679 München  
 ALLEMAGNE

Patentanwalt

Date of mailing (day/month/year) 02 February 2001 (02.02.01)	
Applicant's or agent's file reference 18061P WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP99/05145	International filing date (day/month/year) 20 July 1999 (20.07.99)
Applicant WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

AU,CA,CN,JP,KP,KR,NZ,PL,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,EP,AE,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CH,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,  
 HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,PT,RO,RU,SD,SE,  
 SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Claudio Borton  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

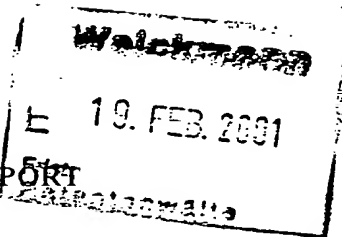
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)



Applicant's or agent's file reference 18061P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05145	International filing date (day/month/year) 20 July 1999 (20.07.99)	Priority date (day/month/year) 20 July 1998 (20.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61K 47/48		
Applicant WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 February 2000 (04.02.00)	Date of completion of this report 30 October 2000 (30.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

☒ the international application as originally filed.

☒ the description. pages 1-28, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims. Nos. 1-18, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_;  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_  
☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 16

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 16  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☒ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-9.14-16.18

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/05145

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claim 16 concerns subject matter which, in the opinion of this authority, is covered by PCT Rule 67.1(iv).

Therefore no expert opinion on the industrial applicability of the subject matter of this claim will be established (PCT Article 34(4)(a)(i)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/05145

**Supplemental Box**  
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

The present international application contains a number of (groups of) inventions:

1. Claims 1 to 9, 14 to 16 and 18

Use of compounds of formula I for producing an agent for the diagnosis, treatment and prevention of urokinase- or urokinase-receptor associated diseases;

2. Claims 10 to 13 and 18

Use of compounds of formula II to produce an agent for targeting lymph cells.

A) Formula II is far broader than formula I and actually defined only as a phenyl group.

The compounds of formula II do not have the essential structural features of formula I.

B) Moreover, the claimed uses are not linked by a common concept (the targeting of lymph cells has nothing to do with urokinase-associated diseases).

Even taken alone, each of the above grounds is sufficient to deny unity of invention (PCT Rule 13.1).



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05145

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 9, 14 - 16, 18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 9, 14 - 16, 18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	18	YES
	Claims	1 - 9, 14 - 16	NO

## 2. Citations and explanations

## 1. Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-96/05189  
D2: WO-A-92/08709  
D3: WO-A-94/18185  
D4: EP-A-0 183 271  
D5: DE-A-30 35 086  
D6: WO-A-95/17885.

## 2. The compounds used in the present application are known from D1 to D3 as thrombin and/or trypsin inhibitors.

D4 and D5 indicate that thrombin and/or trypsin inhibitors are very often also urokinase inhibitors.

The fact that the compounds used in the present application also inhibit urokinase must therefore be considered obvious.

D6 discloses the fact that tumours, and above all the formation of metastases, can be prevented by the use of urokinase inhibitors.

Therefore the subject matter of the present application lacks the necessary inventive step (PCT Article 33(3)).

3. The claimed compound (Claim 18) is novel over the prior art. However, very similar compounds having the same activity are known from D1. Therefore the compound cannot be considered inventive (PCT Article 33(3)).
4. The PCT Contracting States have no uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 1 to 9 and 14 to 16 in their present form. Patentability may also depend on the wording of the claims. The EPO does not, for example, recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical application.

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 18061P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05145	International filing date (day/month/year) 20 July 1999 (20.07.99)	Priority date (day/month/year) 20 July 1998 (20.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61K 47/48		
Applicant WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 February 2000 (04.02.00)	Date of completion of this report 30 October 2000 (30.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-28, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-18, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 16

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 16 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet.

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05145

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☒ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-9,14-16,18

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05145

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claim 16 concerns subject matter which, in the opinion of this authority, is covered by PCT Rule 67.1(iv).

Therefore no expert opinion on the industrial applicability of the subject matter of this claim will be established (PCT Article 34(4)(a)(i)).

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

The present international application contains a number of (groups of) inventions:

1. Claims 1 to 9, 14 to 16 and 18

Use of compounds of formula I for producing an agent for the diagnosis, treatment and prevention of urokinase- or urokinase-receptor associated diseases;

2. Claims 10 to 13 and 18

Use of compounds of formula II to produce an agent for targeting lymph cells.

A) Formula II is far broader than formula I and actually defined only as a phenyl group.

The compounds of formula II do not have the essential structural features of formula I.

B) Moreover, the claimed uses are not linked by a common concept (the targeting of lymph cells has nothing to do with urokinase-associated diseases).

Even taken alone, each of the above grounds is sufficient to deny unity of invention (PCT Rule 13.1).



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05145

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 9, 14 - 16, 18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 9, 14 - 16, 18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	18	YES
	Claims	1 - 9, 14 - 16	NO

**2. Citations and explanations****1. Reference is made to the following documents:**

D1: WO-A-96/05189  
D2: WO-A-92/08709  
D3: WO-A-94/18185  
D4: EP-A-0 183 271  
D5: DE-A-30 35 086  
D6: WO-A-95/17885.

**2. The compounds used in the present application are known from D1 to D3 as thrombin and/or trypsin inhibitors.**

D4 and D5 indicate that thrombin and/or trypsin inhibitors are very often also urokinase inhibitors.

The fact that the compounds used in the present application also inhibit urokinase must therefore be considered obvious.

D6 discloses the fact that tumours, and above all the formation of metastases, can be prevented by the use of urokinase inhibitors.

Therefore the subject matter of the present application lacks the necessary inventive step (PCT Article 33(3)).

3. The claimed compound (Claim 18) is novel over the prior art. However, very similar compounds having the same activity are known from D1. Therefore the compound cannot be considered inventive (PCT Article 33(3)).
4. The PCT Contracting States have no uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 1 to 9 and 14 to 16 in their present form. Patentability may also depend on the wording of the claims. The EPO does not, for example, recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical application.